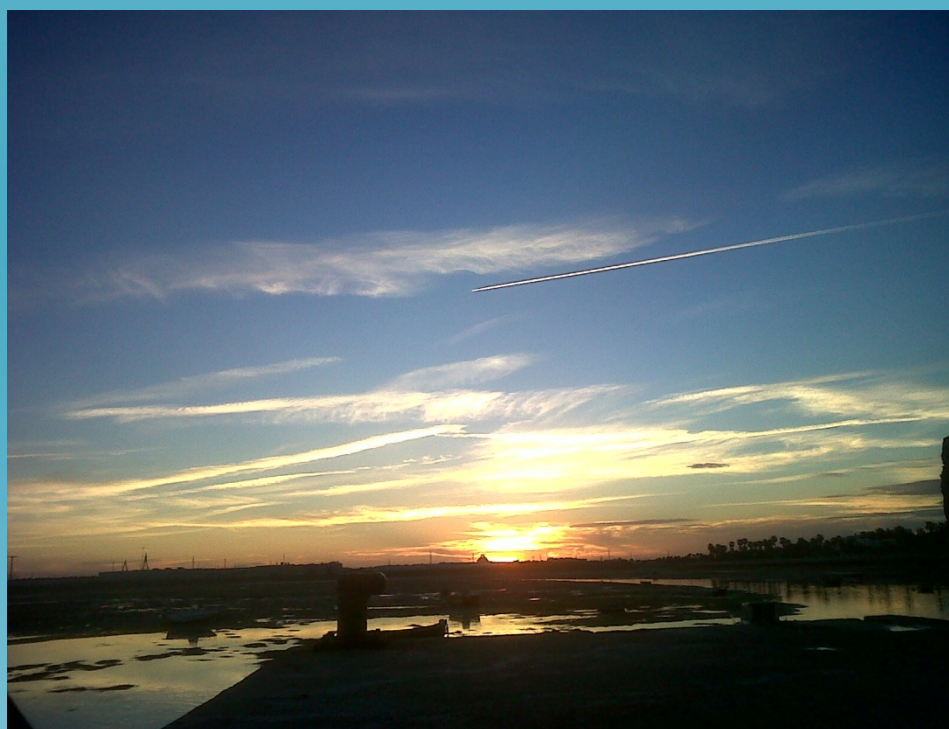




Evaluación de sistemas de microextracción en
fase líquida con capilares de fibra hueca para la
separación de micro y nano fracciones
metálicas en aguas naturales



Máster en Gestión Integral del Agua

Curso 2012/2013

Macarena Silva García



MÁSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DEL AGUA

D./Dña. Carolina Mendiguchía Martínez y Juan José Pinto Ganfornina,
Directores/Tutores del Trabajo de Investigación del alumno/a Macarena Silva García en el
Curso 12/13 da su Visto Bueno a la presentación de la Memoria del Perfil Investigador
titulada: Evaluación de sistemas de microextracción en fase líquida con capilares de fibra
hueca para la separación de micro y nano fracciones metálicas en aguas naturales.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en el Campus de Puerto
Real a 22 de noviembre de 2013.

VºBº

Fdo: Carolina Mendiguchía Martínez

Fdo: Juan José Pinto Ganfornina

El presente Proyecto fin de Máster forma parte de los estudios realizados bajo el soporte económico del proyecto “Sistemas de separación química basados en membranas para la cuantificación de especies metálicas biodisponibles, y sus micro y nano fracciones en aguas naturales” (CTM2010- 15618/TECNO) del Plan Nacional de Investigación 2010-2013 del Ministerio de Economía y Competitividad.

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	3
NÍQUEL EN EL MEDIO AMBIENTE	4
HF-LPME: MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS	6
CONFIGURACIONES HF-LPME	7
MECANISMOS DE TRANSPORTE	9
APLICACIONES DE HF-LPME.....	9
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	13
PROTOCOLO DE MONTAJE.....	14
SISTEMAS QUÍMICOS.....	17
<i>Sistema Ni-DEHPA:</i>	17
<i>Sistema Ni-1,2-CHBBH:</i>	17
ESTUDIOS DE COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS HF-LPME CON DISTINTAS FIBRAS.....	18
<i>Cálculo de las longitudes de fibra para volumen de fase receptora constante:</i>	18
<i>Cálculo de las longitudes de fibra para área efectiva constante:</i>	19
CÁLCULO DEL FACTOR DE ENRIQUECIMIENTO (FE) Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%E).....	20
TÉCNICAS Y EQUIPOS.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
EFECTO DEL TIPO DE FIBRA PARA EL SISTEMA Ni-DEHPA	23
<i>Volumen de fase receptora constante:</i>	25
<i>Área efectiva constante:</i>	28
EFECTO DEL TIPO DE FIBRA PARA EL SISTEMA Ni-1,2-CHBBH	32
<i>Volumen de fase receptora constante:</i>	33
<i>Área efectiva constante:</i>	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	41
Anexo I: Materiales, Instrumentación y Reactivos	47
Anexo II: Síntesis del reactivo 1,2-CHBBH	49

OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la aplicabilidad de los sistemas de microextracción líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME, hollow fiber liquid phase microextraction) a la discriminación de micro- y nano- fracciones metálicas presentes en la fracción disuelta de las aguas naturales.

Para ello se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar el efecto del tamaño de poro de las fibras utilizadas en la extracción de los contenidos totales de níquel en aguas naturales.
- Estudiar la extracción de las distintas fracciones de níquel (lábil y no lábil) en aguas naturales, viendo el efecto que puede producir el tamaño de poro de las fibras utilizadas.
- Evaluar el efecto del tiempo de extracción sobre la fracción de metal extraída para cada uno de los sistemas en estudio.

INTRODUCCIÓN

Los metales constituyen uno de los grupos de contaminantes que causan una mayor preocupación global debido a que pueden llegar a ser tóxicos incluso a bajas concentraciones teniendo un gran impacto tanto en el medioambiente como en la vida de las personas. De acuerdo con la organización mundial de la salud, los metales mas tóxicos son aluminio, cromo, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio y plomo [1]. Por este motivo son muchos los esfuerzos destinados a conocer las concentraciones de estos metales en los distintos compartimentos ambientales.

Aunque habitualmente la presencia de metales en el medioambiente tiene un origen natural, un aumento en sus niveles de concentración suele estar relacionado con actividades antropogénicas. Así, en ecosistemas acuáticos, la presencia de éstos de manera natural puede relacionarse con fenómenos tales como el lixiviado producido por los ríos durante su camino hacia el océano y por las corrientes oceánicas en el fondo de éste. Además, también pueden incorporarse al medio acuático desde la atmósfera a través de la deposición de polvos terrestres. En algunos casos, los metales también pueden ser introducidos por la biota [2].

Sin embargo, el aumento de las concentraciones en aguas naturales, se debe generalmente al origen antrópico de los metales. Esta entrada en los sistemas acuáticos, puede producirse en primer lugar a través de la atmósfera, llegando estos elementos a ella como partículas o como vapores debido a la combustión de combustibles fósiles, producción de cemento y a la industria metalúrgica extractiva. Además de esta vía de entrada, los metales llegan al medio acuático debido a las descargas de las aguas tratadas de las depuradoras, así como, de las aguas procedentes de la industria, la agricultura y la minería [3], siendo estas actividades conocidas por generar importantes cantidades de residuos como cenizas, lodos y vertidos líquidos [4-6].

De entre todos los metales presentes en el medio ambiente la Directiva Marco de Aguas recoge cuatro de ellos como sustancias prioritarias entre los que se encuentra el níquel, objeto de este estudio [7].

Esta directiva es de referencia en todos los estudios que evalúan el estado ambiental del medio acuático, ya que su objetivo es mantener y mejorar el medio

acuático de la comunidad, refiriéndose principalmente a la calidad de las aguas afectadas. Para lograr una buena calidad es imprescindible establecer un control cuantitativo que permita evaluar el estado actual del medio y evaluar las medidas necesarias para reducir progresivamente la contaminación producida principalmente por las sustancias peligrosas. Es por este motivo que la búsqueda de nuevas metodologías que permitan un análisis rápido y sencillo de estas sustancias prioritarias es un campo de especial interés y es este marco el que se encuadra el presente trabajo.

Por otro lado, en los últimos años se ha tomado un interés especial en la discriminación de las nanofracciones metálicas dado el aumento de los estudios sobre los efectos que las nanopartículas tienen en el medioambiente. Es por esta razón que el presente trabajo trata de evaluar la aplicabilidad de sistemas ya existentes para el análisis de metales en aguas naturales para discriminar y cuantificar las nanofracciones, entendiendo éstas como aquellas fracciones metálicas inferiores a $0,1\ \mu\text{m}$.

NÍQUEL EN EL MEDIO AMBIENTE

Aunque el níquel se considera un elemento esencial para los organismos, también se encuentra entre los metales más tóxicos, como se mencionó anteriormente. Además, su presencia en el medio se ha incrementado notablemente durante los últimos años como consecuencia de su empleo en diferentes actividades antropogénicas. En este sentido, es uno de los elementos más importantes para la industria, principalmente para la metalurgia y la minería [8], ya que es utilizado para la fabricación de aleaciones y acero.

Algunas de las fuentes más contaminantes, son el proceso de combustión de aceites y combustibles residuales, la extracción de níquel y la incineración de residuos municipales, la cual representa el 90% del total de las emisiones de níquel al medio ambiente [9]. Por otro lado, recientemente se ha aplicado para otros usos menos tradicionales como por ejemplo en piscifactorías como fungicida [10].

Los niveles de concentración de níquel habituales en aguas naturales suelen ser en torno a $0,2\text{--}0,7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en los océanos y $2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en ríos [9], pero en aguas contaminadas (normalmente aguas procedentes de industrias) pueden llegar a $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [11]. El

Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema de saneamiento establece como valores límites una concentración máxima de níquel de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [12]. Por otro lado, la Directiva Marco de Aguas establece como criterio de calidad una media anual de $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [7], es decir, para considerar que el agua se encuentra en un buen estado químico respecto a la concentración de níquel, ésta no debe superar ese valor. Sin embargo, DeForest y col. han publicado recientemente que una de las especies más sensibles a este elemento es la especie tropical *Diadema Antillarum* (erizo negro), ya que incluso una concentración de $2,9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ puede afectarla [13].

No obstante, para evaluar la toxicidad potencial de este elemento en el medio acuático no basta con conocer los contenidos totales de éste, sino que es necesario diferenciar las distintas especies químicas que se puedan formar, puesto que solo aquellas que sean capaces de ser absorbidas por los organismos son las que causaran efectos nocivos sobre éstos. En este sentido, es habitual diferencia entre la fracción lábil y no lábil de un metal, siendo la fracción lábil de un metal aquella que se encuentra como ión libre hidratado o como complejos fácilmente intercambiables. Estos son los que causan mayor efecto o son tóxicos para los organismos, ya que se encuentran más biodisponibles para ellos [14,15]. Por otro lado, se entiende por fracción no lábil aquella en la que el metal está formando complejos más estables [16].

Por estos motivos, es necesario desarrollar métodos que permitan obtener no sólo la concentración total del metal sino también la fracción más disponible para los organismos. Sin embargo, debido a las bajas concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a la que los metales aparecen en el medio acuático así como a la complejidad de la matriz, la cuantificación de éstos por métodos convencionales requiere generalmente de una etapa previa de preconcentración y/o separación del metal [17].

Algunos métodos de preconcentración y/o separación tradicionales como la extracción líquido líquido (LLE), tiene el inconveniente de utilizar grandes cantidades de disolventes orgánicos, y por tanto la generación de residuos. Aunque la extracción en fase sólida reduce en parte este problema sigue requiriendo una considerable manipulación de las muestras, teniendo grandes riesgos de contaminación.

A partir de los 90, se empezó a ver el impacto ambiental que los disolventes pueden tener en nuestro planeta. Concretamente en las aguas naturales, ya sea ríos,

mares y océanos, puesto que, estos compartimentos ambientales son indispensables para la vida. Debido a este problema apareció lo que se denomina “Química Verde”. Este concepto incide sobre el efecto que puede tener el uso o síntesis de un reactivo no solo sobre el medio, sino también sobre las personas. Y entre sus objetivos se encuentra el intento de reducir tanto el volumen de estos disolventes como la sustitución de aquellos que sean altamente tóxicos por otros más inocuos [18].

Es a partir de este momento cuando aparecen las técnicas de miniaturización para la preparación de las muestras, especialmente en el paso de separación/preconcentración. Una de éstas técnicas, es la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME), la cual utiliza membranas líquidas. Ésta se ha aplicado a numerosos estudios tanto para muestras biológicas como para muestras medioambientales. Además dentro de esta última, se ha utilizado para conocer tanto los contenidos totales como la especiación de metales [19-24]. Ésta se presenta como una alternativa adecuada ya que reduce en gran medida la cantidad de disolvente utilizado y como consecuencia el volumen de residuos tóxicos generados durante el análisis. De hecho, forman parte de las denominadas técnicas “solventless” debido al reducido volumen de disolvente utilizado [19].

HF-LPME: MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS

Una membrana líquida (ML) es, esencialmente, una barrera líquida que separa dos disoluciones inmiscibles con ella y a través de la cual se realiza un transporte de especies químicas. La disolución donde se encuentra la especie que se quiere transportar se denomina disolución cargada, y la disolución de destino se denomina disolución receptora [25]. Generalmente estas disoluciones son acuosas y la membrana líquida entre ambas una disolución orgánica. De este modo el analito es extraído desde la disolución cargada a la fase orgánica y simultáneamente de la fase orgánica a la receptora, produciendo su separación de la matriz de la muestra. Si el volumen de fase receptora es menor que el de fase cargada se produce además la preconcentración del analito.

Aunque existen distintas configuraciones de membrana líquida, son las membranas líquidas soportadas las que permiten reducir considerablemente el volumen de reactivos utilizados [26]. Estas membranas utilizan un volumen muy pequeño de fase orgánica, en este caso impregnando el interior de los poros de un soporte polimérico hidrofóbico poroso de polipropileno generalmente de forma plana o tubular (capilares de fibra hueca), tal y como se muestra en la figura 1.

En el caso de los capilares de fibra hueca, en el interior de la fibra se introduce una de las disoluciones acuosas, generalmente la receptora y ésta es sumergida en la otra disolución acuosa, generalmente la cargada.

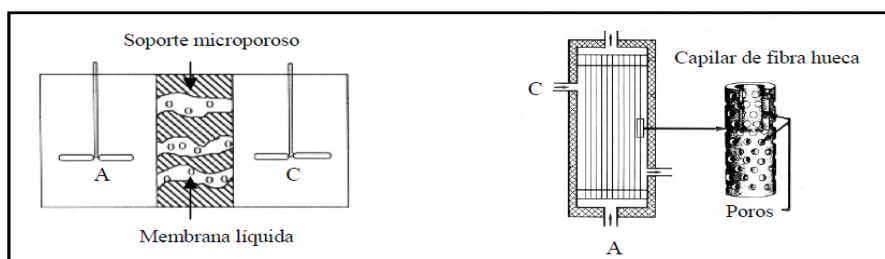


Figura 1. Esquema de una membrana líquida soportada con geometría laminar y capilar de fibra hueca. (A) Disolución cargada; (C) Disolución receptora.

CONFIGURACIONES HF-LPME

Existen diferentes configuraciones para el empleo de HF-LPME, sin embargo, el más habitual para el análisis de metales es el modo de trabajo con tres fases. En este modo el interior de los capilares se llena con la disolución receptora, mientras que la muestra queda en el exterior. La disolución orgánica se encontraría impregnando los poros, de forma que el transporte del metal se realiza mediante su extracción desde la muestra a la fase orgánica y la reextracción simultánea desde la disolución orgánica hacia la receptora.

Además, podemos encontrar distintos diseños como se puede ver en la figura 2.

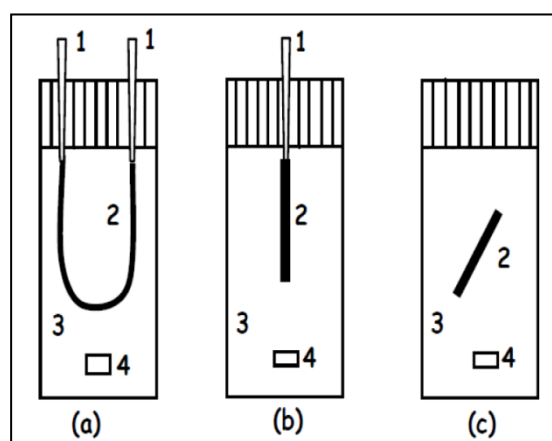


Figura 2. Diferentes diseños de los sistemas HF-LPME. **1:** Jeringa, **2:** Fibra hueca, **3:** Fase cargada, **4:** Agitador.

En primer lugar (Figura 2a) tenemos el diseño en forma de “U”. Este diseño es el más utilizado para el sistema de trabajo de tres fases, ya que permite introducir la fase receptora con mayor facilidad, posteriormente a la fase orgánica que impregna los poros, introduciéndola después en la fase cargada [27, 28].

En segundo lugar (Figura 2b) se encuentra la fibra sellada por uno de sus extremos y conectada a una jeringa en el otro extremo. El modo de preparación de la fibra sería: introducir la fase receptora en el interior del capilar con ayuda de la jeringa, después se sella uno de los extremos de la fibra. A continuación, se introduce unos segundos en la fase orgánica de manera que le dé tiempo a los poros a impregnarse, para después introducirla en la fase cargada. Una vez finalizada la extracción se recupera la fase del interior de la fibra con la ayuda de la jeringa.

Éste diseño se ha empezado a emplear sobre todo en estos últimos años para los sistemas de extracción con electromembranas (EME). Esta técnica tiene este diseño con la salvedad de que se colocan dos electrodos conectados a una fuente de energía y uno de ellos se introduce dentro del capilar de fibra hueca [29, 30].

Y en último lugar (Figura 2c), tenemos el diseño escogido para este trabajo, que consiste en dejar la fibra libre en la fase cargada, una vez que ésta ha sido preparada previamente, con ambos extremos sellados. Este diseño se explica detenidamente en el desarrollo experimental.

MECANISMOS DE TRANSPORTE

El transporte de las especies metálicas a través de la membrana puede llevarse a cabo por dos tipos de mecanismos, dependiendo del modo de trabajo elegido: simple, donde la membrana líquida es simplemente un disolvente orgánico y el transporte del analito se produce por simple difusión; y asistido, donde con la adición de un extractante se favorece el transporte del metal [25].

Como ya se ha comentado anteriormente, el modo de trabajo para este estudio fue el de tres fases. En este modo, se produce simultáneamente una extracción y reextracción del analito, pudiéndose dar varios tipos de transporte. Por ejemplo, en el transporte asistido la membrana lleva además disuelto un agente extractante que actúa como transportador de las especies. En este último podemos diferenciar los siguientes:

- Transporte facilitado: En este caso el transporte puede producirse por la permeación simple del soluto o también porque éste pueda reaccionar con el agente extractante, lo que permite que el proceso de transporte se acelere.
- Contratransporte acoplado: donde la especie de interés reacciona con el extractante formando un complejo que difunde a través de la membrana, hasta ponerse en contacto con la disolución receptora, donde se produce la reacción inversa, liberando así la especie de interés.
- Cotransporte acoplado: En este caso el metal de interés, forma complejo con otra especie química que se encuentra presente también en la fase cargada, de esta manera se mantiene la neutralidad de los complejos formados en la disolución orgánica.
- Transporte primario activo: El proceso es el mismo que en el cotransporte acoplado, la diferencia se encuentra, en que el transporte se ve facilitado por reacciones redox que ocurren en la superficie de la membrana.

APLICACIONES DE HF-LPME

El uso de membranas líquidas soportadas para la separación y concentración de iones metálicos ha recibido una considerable atención desde las últimas décadas, debido a sus numerosas ventajas, como la facilidad de operación, la alta selectividad y los bajos

costes de operación [31]. Además, éstas se están usando para recuperación de metales en los procesos industriales, no solo debido al valor de estos, sino también para satisfacer cada vez más los requisitos de la legislación.

Por otro lado, el uso de estas membranas líquidas soportadas se está empleando para la extracción simultánea de muchos metales como Cu, Zn, Ni, Hg Cd y Cr de las aguas contaminadas [32, 33].

Sin embargo, el uso de las membranas líquidas soportadas aún tiene que encontrar su aplicación comercial. Aunque científicamente se está encontrando su gran potencial, el deterioro de la economía mundial en estos últimos años ha hecho que aun no se hayan animado a la inversión de esta nueva tecnología de extracción [34].

En resumen, en este proyecto se han utilizado los sistemas de microextracción líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME) como sistema de separación y preconcentración para el análisis de níquel en aguas naturales. Estos sistemas se basan en el uso capilares de fibra hueca hidrófoba, de un diámetro interno muy pequeño (en general de algunos centenares de micras). Los sistemas que se han estudiado utilizan el modo de trabajo con tres fases, de forma que el transporte del metal se realiza mediante su extracción desde la muestra a la fase orgánica y la reextracción simultánea desde la disolución orgánica hacia la receptora, como se comentó anteriormente.

Estos sistemas ya han sido desarrollados y optimizados previamente para la extracción de níquel en aguas naturales. El primero de ellos utilizaba la fibra Accurel PP Q3/2, con un tamaño de poro de 0,2 μm , para la extracción de los contenidos totales de níquel en aguas naturales mediante una disolución orgánica de ácido di-2-etilhexil fosfórico (DEPHA) disuelto en keroseno y con ácido nítrico como reextractante. En el segundo caso, el sistema desarrollado permitía la separación de la fracción lábil y no lábil de níquel en aguas naturales utilizando la fibra Accurel PP S6/2 (de 0,2 μm de tamaño de poro) y como extractante orgánico un derivado de la hidrazona, la 1,2-ciclohexanodiona bis benzoíl-hidrazona (1,2-CHBBH) disuelto en tolueno.

El transporte del metal se lleva a cabo mediante contratransporte acoplado, donde la especie de interés reacciona con el extractante formando un complejo que difunde a través de la membrana, hasta ponerse en contacto con la disolución receptora, donde se produce la reacción inversa, liberando así la especie de interés.

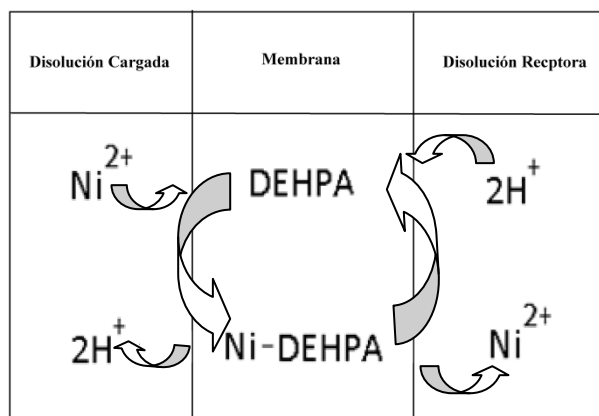


Figura 3. Mecanismo de transporte de níquel a través de la membrana líquida con DEHPA.

Para el caso de los contenidos totales fue utilizado un extractante comercial, DEHPA. Este es un extractante ácido, que ayuda al transporte de níquel, formando complejo con éste [34], como se aprecia en la figura 3.

Para la fracción lábil del metal se usó como extractante el 1,2-CHBBH, este reactivo también forma complejo con el níquel [35], mostrándose el sistema de transporte en la figura 4:

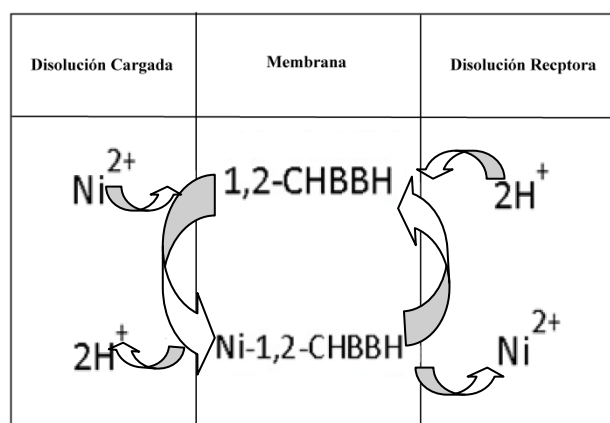


Figura 4. Mecanismo de transporte de níquel a través de la membrana líquida con 1,2-CHBBH.

Como se ha comentado, ambos sistemas han sido desarrollados con fibras cuyo tamaño de poro es de $0,2\ \mu\text{m}$, por lo que no sería posible su aplicación a la separación de las nanofracciones. Por este motivo en el presente trabajo se plantea el traslado de estos sistemas a capilares con menor tamaño de poro ($0,1\ \mu\text{m}$), en este caso la fibra Accurel PP 50/280. Se ha planteado por tanto como un trabajo preliminar para evaluar la aplicabilidad de estos sistemas a la separación de las nanofracciones, para lo cual se ha estudiado el efecto sobre la extracción del cambio de fibra. En este sentido se realizaron distintos estudios utilizando las condiciones químicas optimizadas previamente para los dos sistemas propuestos en tres tipos de fibra con distintas características: la Accurel PP 50/280 (con tamaño de poro de $0,1\ \mu\text{m}$) y las Accurel PP S6/2 y Accurel PP Q3/2, ambas con un tamaño de poro de $0,2\ \mu\text{m}$.

Para realizar la comparación de los distintos tipos de fibra se procedió de dos formas diferentes. Por un lado se estudió el efecto del cambio de fibra en las fracciones de níquel extraídas manteniendo el volumen de la disolución receptora constante, y por otro se repitió el estudio pero manteniendo constante el área efectiva de extracción, es decir, el área de fase orgánica en contacto con las disoluciones acuosas.

En todos los casos se realizó el estudio de la extracción del metal a distintos tiempos de extracción, viendo por tanto su evolución temporal.

Finalmente, para evaluar la cantidad de metal extraído en cada caso, se midió la disolución receptora extraída mediante espectroscopia de absorción atómica de llama y/o horno de grafito.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Con el fin de evaluar el efecto del tipo de fibra utilizado en HF-LPME sobre el factor de enriquecimiento se emplearon los tres capilares de fibra hueca que se muestran en la figura 5. Las características de cada una de ellas se recogen en la tabla 1.

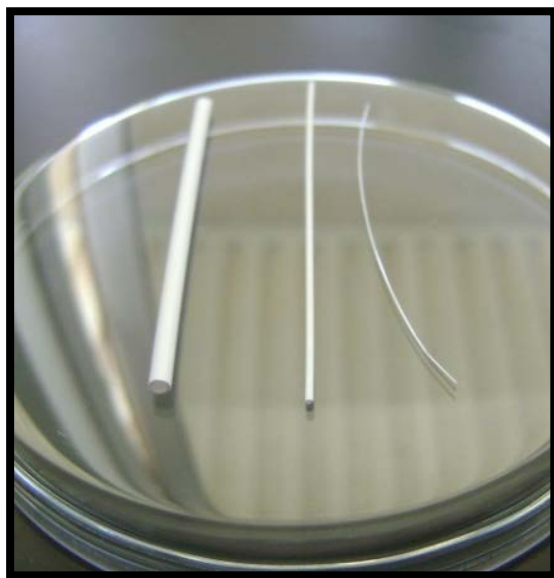


Figura 5: Fibras huecas utilizadas en este trabajo. De izquierda a derecha Accurel PP S6/2, Accurel PP Q3/2 y Accurel PP 50/280.

Fibra	Φ interno (μm)	Tamaño de poro (μm)	Porosidad (%)	Espesor de la pared (μm)
Accurel PP 50/280	280	0,1	60	50
Accurel PP Q3/2	600	0,2	75	200
Accurel PP S6/2	1800	0,2	72	450

Tabla 1: Características de los tres tipos de fibra hueca [26,36].

Para llevar a cabo los estudios experimentales se emplearon dos sistemas de HF-LPME que han sido desarrollados y optimizados previamente por el grupo de investigación para la extracción de níquel en aguas naturales. El primero de ellos utilizaba la fibra Accurel PP Q3/2, con un tamaño de poro de 0,2 μm , para la extracción de los contenidos totales de níquel en aguas naturales. En este sistema la fibra se impregna con una disolución de ácido di-2-etilhexil fosfórico (DEPHA) disuelto en

keroseno, que actúa como membrana líquida, mientras que en su interior tenemos ácido nítrico como re-extractante [19].

En el segundo caso el sistema desarrollado permitía la separación de la fracción lábil y no lábil de níquel en aguas naturales utilizando la fibra Accurel PP S6/2 con igual tamaño de poro de 0,2 μm . En esta ocasión la fibra se impregna con un extractante orgánico derivado de la hidrazona, la 1,2-ciclohexanodiona bis benzoíl-hidrazona (1,2-CHBBH) disuelto en tolueno. Y como agente re-extractante se utilizó ácido clorhídrico [37].

PROTOCOLO DE MONTAJE

A continuación se describe el protocolo de montaje para la fibra intermedia (Accurel PP Q3/2) y la pequeña (Accurel PP 50/280) que fue el mismo, mostrándose en la figura 6 cada uno de los pasos.

1. Se corta la longitud necesaria de fibra y se limpia su interior utilizando una jeringa farmacéutica para hacer pasar unos 300 μl de disolución receptora.
2. Con el extremo de la jeringa aún introducido en la fibra y con el lumen lleno de disolución receptora, se impregna la misma durante 1 minuto en la disolución orgánica. De esta manera la disolución orgánica se introduce en los poros de la fibra.
3. Después se vuelve a introducir 200 μl de la disolución receptora mediante la jeringa para eliminar el exceso de disolución orgánica y evitar que ésta quede con aire en su interior.
4. A continuación se sella la fibra por los extremos con Parafilm y se introduce durante unos segundos en agua milliQ, para eliminar el exceso de disolución orgánica que aún pueda quedar en el exterior de ésta.
5. La fibra se introduce completamente en la disolución cargada que se encuentra en un bote de polipropileno de baja densidad de unos 30 ml y se cierra herméticamente. En cada experimento se emplean dos fibras sumergidas en la misma muestra.

6. Por último se procede a la agitación del sistema a 500 rpm, para mejorar la extracción del metal.
7. Una vez pasado el tiempo de agitación se procede a la extracción de la gota de fase receptora, cortando el Parafilm e impulsando aire con ayuda de una jeringa, para recuperarla en un tubo de vidrio. Esta gota de disolución receptora, se diluye a un volumen determinado, dependiendo del sistema, para hacer posible su posterior análisis.

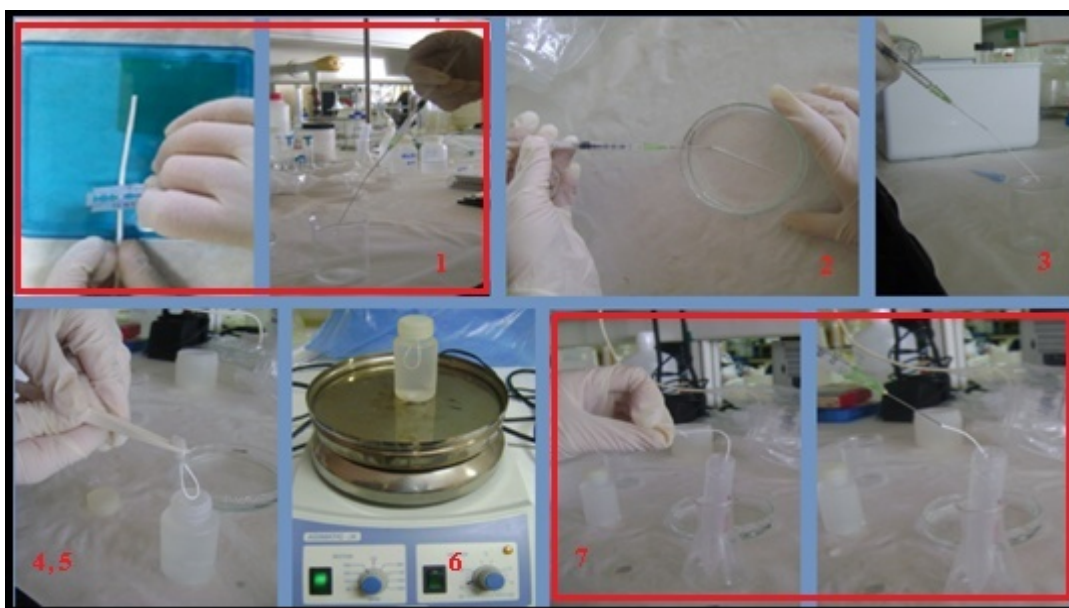


Figura 6: Protocolo para el montaje del sistema para las fibras Accurel PP 50/280 y Accurel PP Q3/2.

Debido al grosor de la fibra Accurel PP S6/2 fue preciso modificar ligeramente el protocolo de montaje, siguiendo los pasos que se recogen a continuación y que se muestran en la figura 7.

1. Se corta la longitud necesaria de fibra y se sella uno de sus extremos con un soldador.
2. Se introduce en su interior la disolución receptora utilizando una jeringa Hamilton hasta que esta rebose, para asegurar que está completamente llena y no contiene aire en su interior.
3. Una vez llena se sella el otro extremo de la fibra, con la ayuda del soldador.

4. A continuación se impregna la misma durante 15 minutos en la disolución orgánica a fin de asegurarnos que se introduce en los poros de la fibra.
5. Después se introduce durante unos segundos en agua milliQ, para eliminar el exceso de disolución orgánica que pueda quedar en el exterior de ésta.
6. La fibra se introduce completamente en la disolución cargada que se encuentra en un bote de polipropileno de baja densidad de unos 30 ml y se cierra herméticamente. En cada experimento se introducen dos fibras en la misma muestra.
7. Por último se procede a la agitación del sistema a 500 rpm, para mejorar la extracción del metal.
8. Una vez pasado el tiempo de agitación se procede a la extracción de la gota de fase receptora. Se corta primero un extremo de la fibra termosellada y se introduce la punta de una micropipeta. Posteriormente, se corta el otro extremo de la fibra e impulsamos aire mediante una micropipeta, para recuperar la disolución receptora en un tubo de vidrio. Esta gota se diluye a un volumen determinado, dependiendo del sistema, para hacer posible su posterior análisis.



Figura 7: Protocolo para el montaje del sistema para la fibra Accurel PP S6/2.

SISTEMAS QUÍMICOS

En este trabajo se partió de dos sistemas químicos previamente optimizados, como se comentó anteriormente. Uno para la extracción de contenidos totales de níquel, utilizando como extractante DEHPA, y otro, para la extracción de las fracciones lábiles de este metal, para el cual se utilizó 1,2-CHBBH.

Sistema Ni-DEHPA:

Las condiciones previas optimizadas para este sistema consistían en:

- Una fase cargada de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni, con un pH de 5 que se mantenía en una disolución 0,1M de tampón acético/acetato. Esta persistencia del pH es necesaria para que tenga lugar el transporte del níquel con DEHPA.
- Una disolución receptora 1M de ácido nítrico.
- Una disolución orgánica 0,9M de DEHPA disuelto en Keroseno.
- La longitud de la fibra fue de 9 cm y la velocidad de agitación de 500rpm.

Sistema Ni-1,2-CHBBH:

En este caso las condiciones optimizadas fueron:

- Una fase cargada de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni, y un pH de 8, típico de las aguas naturales. En este caso el tampón elegido para mantener el pH fue el reactivo ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico (HEPES).
- Una disolución receptora 1,3M de ácido clorhídrico.
- Una disolución orgánica 15mM de 1,2-CHBBH, disuelto en Tolueno y con 16% dimetilformamida (DMF). El 1,2-CHBBH es sintetizado previamente en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito en el Anexo II.
- La longitud de la fibra fue de 10 cm y la velocidad de agitación 500 rpm.

Al realizar los primeros experimentos con este sistema se comprobó que el disolvente utilizado se evaporaba fácilmente, sobre todo en el caso de la fibra más

pequeña (Accurel PP 50/280), para la cual no se pudo recuperar el volumen de disolución receptora. Por esta razón se procedió a hacer un cambio de disolvente. Para ello se llevo a cabo una búsqueda bibliográfica, encontrando que el octanol estaba dando muy buenos resultados como disolvente en otros sistemas de HF-LPME [38, 39], por lo que se empezó a trabajar con él como sustituto del tolueno. El cambio de disolvente implicó disminuir la concentración de 1,2-CHBBH a 3,5mM, debido a que ésta era la máxima concentración que podía ser disuelta en octanol.

ESTUDIOS DE COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS HF-LPME CON DISTINTAS FIBRAS

Para realizar la comparación de los sistemas utilizando las tres fibras descritas anteriormente se utilizó como referencia la fibra Accurel PP Q3/2. Para que los resultados obtenidos con las otras fibras fueran comparables se procedió de dos modos distintos. Por un lado se optó por mantener constante el volumen de disolución receptora, ya que de este modo se mantiene constante el factor máximo de preconcentración que puede obtenerse con cada sistema. Por otro lado se mantuvo constante el área efectiva, es decir, la superficie de disolución orgánica en contacto con la disolución acuosa.

Cálculo de las longitudes de fibra para volumen de fase receptora constante:

Para el sistema Ni-DEHPA, la longitud de la que se partió fue de 9 cm, lo que suponía recuperar 25 µl de la disolución receptora. Mientras que, para el sistema Ni-1,2-CHBBH se partió de 10 cm de longitud, recogiendo un volumen de gota de la fase receptora de 28 µl. Así para conseguir mantener dicho volumen en las otras fibras, se calcula la longitud necesaria de cada una (Tabla 2) en función de su radio, según las expresiones 1 y 2.

$$V = L \cdot A \quad (1)$$

$$V = L \cdot \pi \cdot R^2 \quad (2)$$

Donde L es la longitud de fibra en cm, A es el área en cm², V es el volumen en ml y R el radio interno en cm.

Sistemas	Longitudes (cm)	
	Ni-DEHPA	Ni-1,2-CHBBH
PP 50/280	40	45,5
PP Q3/2	9	10
PP S6/2	1	1,1

Tabla 2: Longitudes de cada fibra en cm, para los distintos sistemas químicos, manteniendo constante el volumen de fase receptora.

Cálculo de las longitudes de fibra para área efectiva constante:

Del mismo modo que en el caso anterior se tomó como referencia las longitudes descritas anteriormente para la fibra Accurel PP Q3/2. Por lo tanto, en primer lugar para obtener el área efectiva a mantener constante en los tres tipos de fibras, se utilizó la siguiente expresión, que permite obtener la superficie total de la fibra.

$$A = L \cdot 2\pi \cdot R \quad (3)$$

En el caso del sistema Ni-DEHPA se obtiene una superficie total de 1,70 cm², mientras que para el sistema Ni-1,2-CHBBH se obtiene una de 1,88 cm². Para conocer cuál es el área efectiva hay que tener en cuenta la porosidad de la fibra (tabla 1) obteniendo un valor de 1,27 cm² para el sistema con DEHPA y de 1,41 cm² para el de 1,2-CHBBH. Tomando este valor como referencia, mediante la porosidad de las otras fibras y la ecuación 8 obtenemos qué longitud es preciso utilizar con cada una de ellas (tabla 3).

Sistemas	Longitud (cm)	
	Ni-DEHPA	Ni-1,2-CHBBH
PP 50/280	24,1	26,7
PP Q3/2	9	10
PP S6/2	3,1	3,5

Tabla 3: Longitudes de cada fibra en cm, para los distintos sistemas químicos, manteniendo el área efectiva constante.

CÁLCULO DEL FACTOR DE ENRIQUECIMIENTO (FE) Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%E)

Para cuantificar la eficacia del transporte de Ni se ha realizado el cálculo del factor de enriquecimiento y el porcentaje de extracción.

El primero de ellos, es la concentración del metal de interés en la fase receptora, respecto a la concentración que teníamos inicialmente en la muestra [26], tal y como se recoge en la ecuación 4.

$$FE = \frac{[Ni]_S}{[Ni]_F} \quad (4)$$

Donde, $[Ni]_S$ es la concentración de Ni en la disolución receptora al final del experimento y $[Ni]_F$ es la concentración de Ni que había inicialmente en la disolución cargada.

Con este factor podemos saber cuántas veces se ha preconcentrado el níquel dentro de la fibra, con respecto a la concentración inicial de la muestra.

Por otro lado, el porcentaje de extracción indica la cantidad de níquel que ha pasado de la disolución cargada a la receptora en tanto por ciento. Es otra manera de ver la eficacia del sistema de transporte, pero en este caso en función de la masa.

$$\%E = \frac{m_s}{m_f} \cdot 100 \quad (5)$$

Donde m_s es la masa de níquel en la fase receptora y m_f la masa de níquel en la fase cargada.

TÉCNICAS Y EQUIPOS

Para la cuantificación del níquel presente en las muestras se trabajó con espectroscopía de absorción atómica (AAS). Esta técnica tiene tres variantes dependiendo del modo de excitación del elemento a determinar (llama, formación de hidruros y horno de grafito), de los cuales se utilizaron dos de ellos, dependiendo de la concentración de níquel que se tenía.

Las muestras con concentraciones más altas de níquel, se midieron por espectroscopía de absorción atómica por llama (FAAS). Con las condiciones que se presentan en la siguiente tabla 4:

Longitud de onda (λ) (nm)	Rendija (nm)	Flujo de la Llama	Flujo de combustible (C_2H_2 -aire) (L/h)	Tipo de mechero (mm)	Altura de quemador (mm)
320	0,2	Aire/acetileno	55	50	6

Tabla 4: Condiciones de medida para el espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Sin embargo, las concentraciones más bajas de níquel tuvieron que ser medidas por espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito (GFAAS), ya que esta técnica tiene límites de detección más bajos.

Las condiciones de trabajo en este caso se presentan en la siguiente tabla:

Etapas	Temperatura ($^{\circ}C$)	Tiempo (s)	Rampa (s)	Flujo argón ($L \cdot min^{-1}$)
Secado	100	30	10	0,2
Secado	130	20	30	0,2
Calcinación	1000	20	150	0,2
Atomización	2400	3	0	0
Limpieza	2600	3	0	0,2

Tabla 5: Programa de temperaturas utilizado para analizar níquel por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, con una $\lambda=232$ nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DEL TIPO DE FIBRA PARA EL SISTEMA Ni-DEHPA

Como se comentó en el desarrollo experimental, los estudios se realizaron tomando como referencia la fibra Accurel PP Q3/2, dado que ésta fue la utilizada para optimizar las condiciones del transporte. Sin embargo, el sistema de montaje descrito en este trabajo tiene algunas variaciones respecto al de referencia tal y como se muestran en la figura 8.

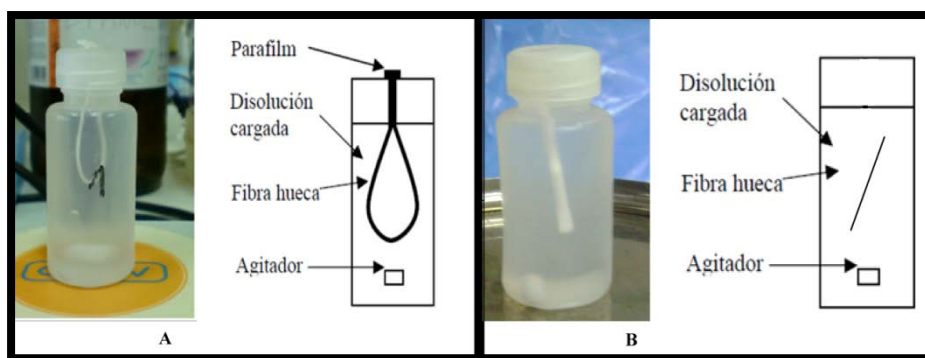


Figura 8: **A:** Sistema de montaje según Vergel y col. [19] **B:** Sistema de montaje utilizado en este estudio.

Vergel y col. [19] introducían la fibra dentro de la fase cargada sujeta al tapón del bote de muestra por los extremos cerrados previamente con Parafilm (figura 8a). En este trabajo el montaje se ha modificado dejando la fibra totalmente libre en la fase cargada (figura 8b). La elección de este montaje se basó en que el objetivo de éste estudio es llevar a cabo la comparación de tres tipos de fibras, por lo que el montaje para las tres debía ser el mismo. Esto suponía que el modo descrito por Vergel y col. no fuera factible, ya que las longitudes de trabajo (Tabla 2 y 3) con las fibras Accurel PP 50/280 y Accurel PP S6/2 impedirían poner en práctica dicho montaje.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para el factor de enriquecimiento en función del tiempo de extracción para la fibra Accurel PP Q3/2 con el sistema de montaje descrito.

Durante las primeras horas el sistema presenta un aumento progresivo del factor de enriquecimiento al aumentar los tiempos de extracción. Este comportamiento se ha observado previamente en sistemas similares debido a que se mejora los procesos de difusión del analito a través de la fibra [24, 40]. Sin embargo, para tiempos más largos de extracción se observa una disminución de este factor, a causa probablemente de la pérdida de estabilidad del sistema. Esta pérdida puede deberse a distintos factores, siendo la más habitual la pérdida de fase orgánica de los poros de la fibra debido a la agitación [41].

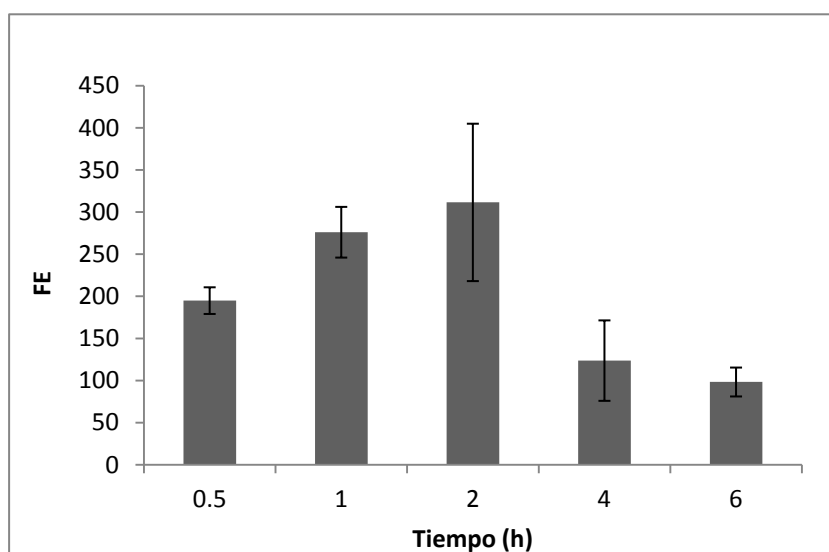


Figura 9: Factor de enriquecimiento para la fibra Accurel PP Q3/2 a distintos tiempos de extracción.

Si se comparan los resultados obtenidos en el estudio que se tomó como referencia con los alcanzados en este trabajo, se observa que en este caso el factor de enriquecimiento es prácticamente la mitad y además es necesario aumentar el tiempo de extracción para que se produzca el transporte. Estas disminuciones del factor de enriquecimiento pueden deberse a las diferencias en el montaje de las fibras, ya que las fibras en este trabajo se verán más afectada por las condiciones hidrodinámicas del sistema al encontrarse flotando libremente en la muestra. Esto hecho implica que el transporte del analito se produzca de manera más irregular, debido a que se encuentra más problemas a la hora de mantener la fase orgánica en el interior de los poros.

A continuación se presentan los resultados obtenidos con las otras fibras cuando se mantiene el volumen de fase receptora constante y cuando se mantiene el área efectiva constante.

Volumen de fase receptora constante:

El objetivo al igualar el volumen de fase receptora es tener un factor de preconcentración teórico igual para todas las fibras, ya que éste se corresponde con la relación de volúmenes entre la muestra y la fase receptora. De esta manera se podrá llevar a cabo la primera comparación, ya que todas las fibras tendrán la capacidad de llegar al mismo máximo de preconcentración.

En primer lugar se muestran los resultados obtenidos para la fibra más pequeña (Accurel PP 50/280) en la figura 10.

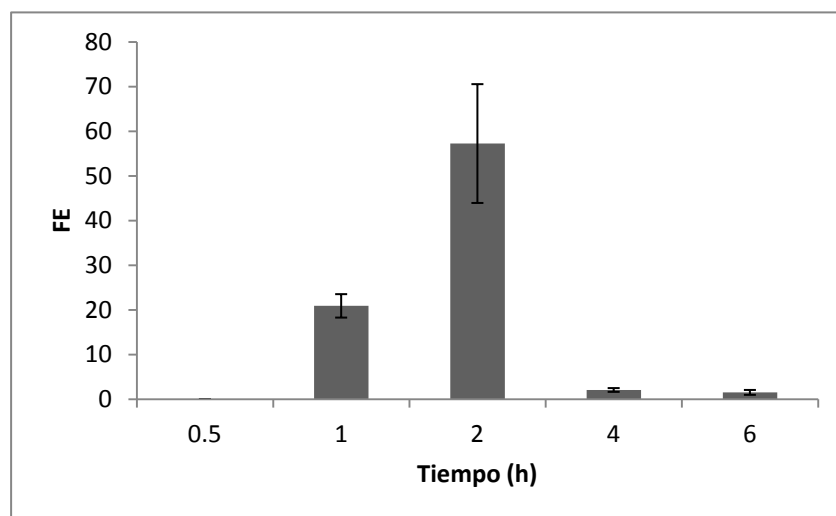


Figura 10: Variación del Factor de enriquecimiento con respecto al tiempo para la fibra Accurel PP 50/280.

En ella se puede ver como el factor de enriquecimiento va aumentando de manera progresiva con el tiempo, alcanzándose el máximo a dos horas. Después de este tiempo de extracción, se aprecia una caída drástica en el transporte debido, como se ha comentado, a la pérdida de estabilidad del sistema. La longitud de fibra con la que se

trabaja en este caso es alta (40 cm) y la velocidad de agitación también es elevada, por lo que al introducir la fibra en la fase cargada, ésta se encuentra expuesta a muchas colisiones con el agitador, provocando que la fase orgánica salga de los poros con mayor facilidad que en el sistema de referencia.

Los resultados para la fibra más grande (Accurel PP S6/2) pueden apreciarse en la figura 11. En ésta se observa como el factor de enriquecimiento aumenta poco a poco alcanzando el máximo a mayores tiempos de extracción, es decir, el transporte tarda más tiempo en producirse. Aunque tenga el mismo tamaño de poro que la fibra de referencia, el espesor de la pared de la fibra es mayor (Tabla 1) lo que implica que la capa de fase orgánica que el analito debe recorrer para llegar a la fase receptora es mayor, lo que conlleva una ralentización en la difusión a través de la fibra [25]. En este caso los problemas de inestabilidad no comienzan a observarse hasta las veinticuatro horas, donde se observa que aunque el sistema sigue extrayendo, empieza a ser cada vez más irreproducible.

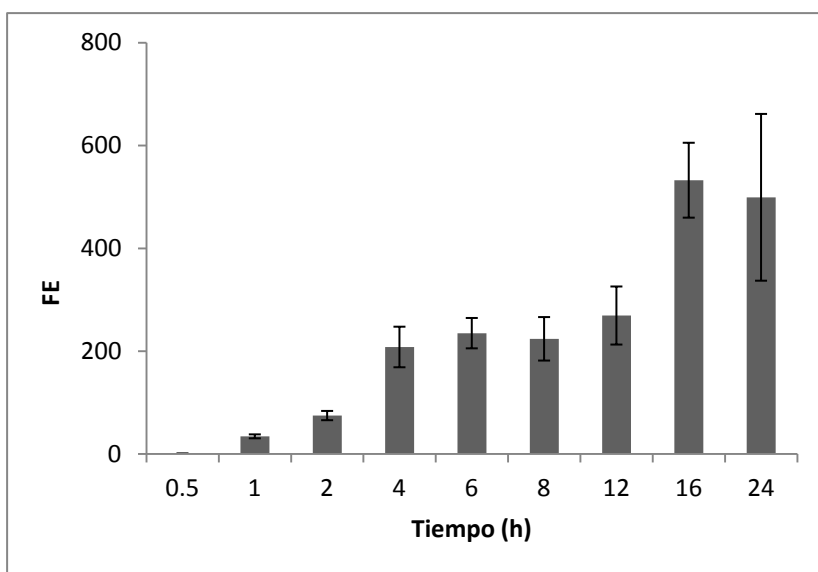


Figura 11: Factor de enriquecimiento a distintos tiempos para la fibra Accurel PP S6/2.

Finalmente, en la figura 12, se presentan los resultados para las tres fibras estudiadas, para el sistema de transporte Ni-DEHPA. En principio cabría esperar que la fibra intermedia presente valores del factor de enriquecimiento mayores, ya que las

condiciones químicas e hidrodinámicas empleadas fueron las optimizadas para ésta. Esto ocurre así para los tiempos de extracción más bajos, aunque este efecto se debe a causas distintas para cada una de las otras fibras. Sin embargo, se ve que para tiempos largos de extracción la fibra más grande consigue mejorar los factores de enriquecimiento de referencia. Esto se debe principalmente a que la fase orgánica en esta fibra es más estable, permitiendo que el transporte continúe durante tiempos más largos.

En el caso de la fibra más pequeña, se aprecia que los factores de preconcentración máximos a los que llega son bastante más bajos que en las anteriores, ya que a una hora llega a un factor de enriquecimiento de 50 frente a los 300 que ofrece la Accurel PP Q3/2 a ese mismo tiempo. Esto puede ser debido a la diferencia en el tamaño de poro, ya que ésta tiene un tamaño de poro de $0,1\ \mu\text{m}$, frente a las $0,2\ \mu\text{m}$ que tienen las otras. Esto implicaría que si se quisiera aplicar el sistema a la separación de micro y nano fracciones habría que tener en cuenta los factores de enriquecimiento que se obtiene para cada caso, así como los tiempos de extracción más adecuados. Al ser la fibra Accurel PP 50/280 la única que permitiría esta separación sería recomendable realizar un estudio exhaustivo del comportamiento de la misma optimizando el sistema.

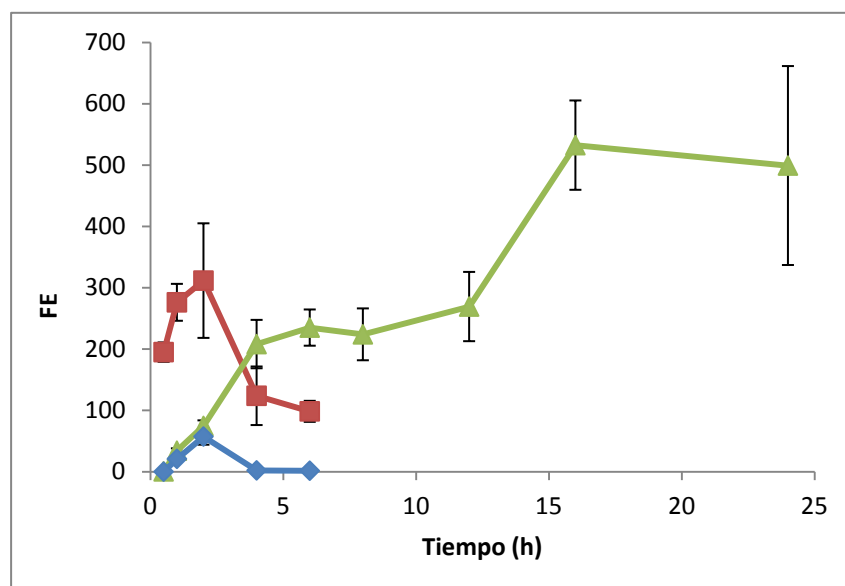


Figura 12: Comparación del Factor de enriquecimiento obtenido para las fibras Accurel PP Q3/2 (rojo), Accurel PP 50/280 (azul) y Accurel PP S6/2 (verde) a lo largo del tiempo.

En el caso de la fibra Accurel PP S6/2, el tamaño de poro es el mismo que en la fibra optimizada, por lo que cabría esperar que llegara al mismo factor de enriquecimiento en el mismo tiempo. Pero como se ha comentado, la diferencia significativa que tenemos entre las dos es el espesor de la fibra, que puede ralentizar el transporte del analito. Por otro lado, hay que tener también en cuenta las longitudes de las fibras, ya que para ésta tenemos una longitud de 1 cm, mientras que para la fibra optimizada es de 9 cm (Tabla 2). Esto implica que la fibra optimizada tiene mayor área efectiva y por tanto mayor superficie de contacto entre la muestra y la fase orgánica, por lo que el transporte pueda producirse más rápidamente, aumentando de esa manera el factor de enriquecimiento para las primeras horas [42].

Por esta última razón se consideró que podía ser útil realizar la comparación manteniendo constante el área efectiva para las tres fibras.

Por último podemos concluir diciendo que a pesar de que la fibra Accurel PP S6/2 consigue los mayores factores de enriquecimiento, necesita un tiempo muy largo para alcanzarlos por lo que para un análisis del contenido de níquel total parece más adecuada la fibra intermedia, que consigue una situación de compromiso entre alto factor de enriquecimiento y tiempos de preconcentración cortos. Como ya hemos dicho, el análisis de las nanofracciones sólo podría realizarse con la fibra más pequeña.

Área efectiva constante:

El estudio del transporte de Ni-DEHPA igualando el área efectiva de las distintas fibras, se llevó a cabo debido a que el transporte del metal depende de la superficie de contacto de la fase orgánica con las fases acuosas [25]. Al mantenerla constante se elimina el efecto que este parámetro puede tener sobre el transporte del analito. Del mismo modo que en el estudio anterior, la fibra Accurel PP Q3/2 fue la de referencia y se calcularon las longitudes necesarias para las otras dos fibras como se mencionó en el desarrollo experimental.

Los resultados obtenidos con la fibra pequeña (Accurel PP 50/280) pueden verse en la figura 13, donde se aprecia que el factor de enriquecimiento va aumentando con el tiempo de extracción hasta dos horas, donde se produce el máximo y después cae de

manera brusca tal y como ocurría en el estudio anterior para esta misma fibra. Aunque en este caso se ha disminuido la longitud de la fibra de 40 a 24,1 cm (Tabla 2y 3), se ve que esto no afecta significativamente a su comportamiento, siendo éste prácticamente el mismo. Aunque la longitud se ha disminuido casi a la mitad, sigue teniendo una longitud considerable y no es posible evitar los problemas de inestabilidad del sistema por la pérdida de la fase orgánica.

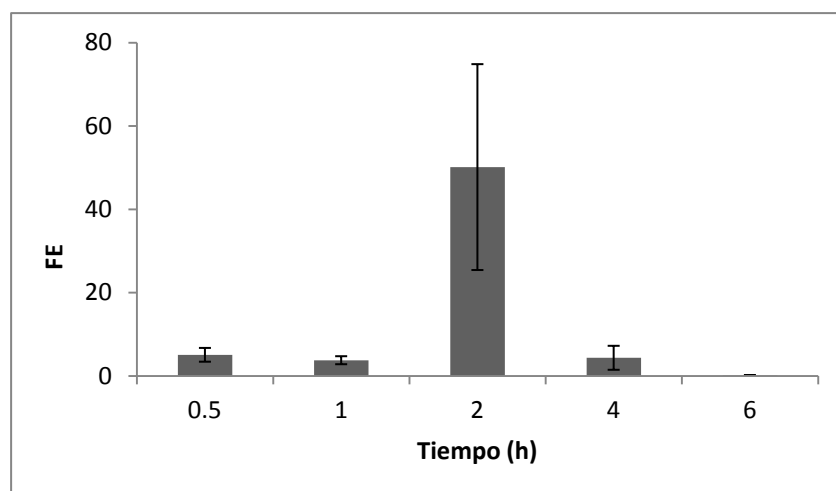


Figura 13: Efecto del Factor de enriquecimiento frente al tiempo para la fibra Accurel PP 50/280.

Con respecto a la fibra Accurel PP S6/2, se puede decir que los mejores factores de enriquecimiento se obtienen a medida que vamos aumentando los tiempos de extracción, teniendo el máximo a doce horas y después comienza a descender, como se puede apreciar en la figura 14.

Este comportamiento también es prácticamente el mismo que en el estudio anterior para esta fibra, pero en este caso la longitud de ésta aumentó de 1 a 3,1 cm (Tabla 2 y 3). Esto nos indica que tiene mayor superficie de contacto entre la fase orgánica y las fases acuosas por lo que el transporte debería verse mejorado, pero por otra parte tenemos el volumen de fase receptora, que en este caso es mucho mayor que en el estudio anterior, lo que implica una disminución de la concentración de analito debido a una mayor dilución [43]. Estos dos factores son contrapuestos y a veces uno de ellos prevalece ante el otro. Según estos resultados, el porcentaje de extracción

alcanzado en los dos casos es prácticamente el mismo, aproximadamente el 40%, por lo que en este caso los dos factores se contrarrestan y el níquel que se transporta es el mismo, aunque el factor de enriquecimiento no lo sea debido a la diferente relación de volúmenes entre las fases acuosas.

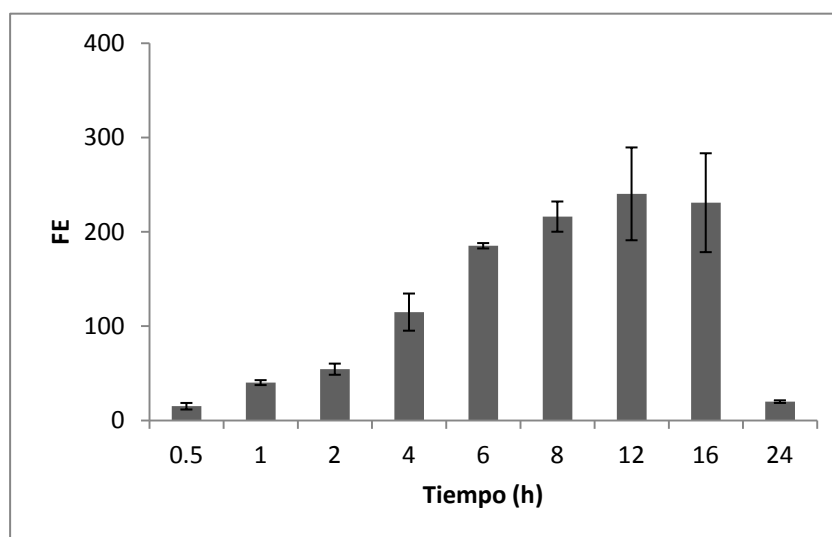


Figura 14. Factor de enriquecimiento de la fibra Accurel PP S6/2 a distintos tiempos.

Finalmente, en la figura 15 se comparan los resultados obtenidos para las tres fibras estudiadas, manteniendo constante su área efectiva. Como se mencionó anteriormente, cabría esperar que la fibra intermedia presentara mayores valores del factor de enriquecimiento, ya que las condiciones químicas e hidrodinámicas empleadas fueron las optimizadas para ésta. Sin embargo, los resultados obtenidos son similares a los observados cuando se mantiene el volumen de fase receptora constante.

La fibra más pequeña, solamente consigue un factor de enriquecimiento de 50 después de dos horas de extracción frente al de 300 que consigue la fibra de referencia, probablemente por la diferencia que existe entre ambas en el tamaño de poro de la fibra. Es necesario señalar que el sistema está optimizado para un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ por lo que sería necesaria la optimización de la pequeña ya que el tamaño de poro de ésta es de $0,1 \mu\text{m}$ y parece que puede ser un parámetro determinante tanto en la estabilidad del sistema como en la velocidad de transporte.

Otro parámetro a tener en cuenta es el máximo factor de preconcentración que podemos tener de cada una de ellas, ya que en este caso se varió el volumen de fase receptora recogida. Teniendo en cuenta este aspecto la fibra que mejores resultados da sería la Accurel PP Q3/2, ya que a pesar de que el máximo factor de enriquecimiento que alcanza es similar al obtenido con la fibra Accurel PP S6/2, llega a él en tan solo dos horas de extracción y consiguiendo en ese momento un porcentaje de extracción de aproximadamente el 20%. Sin embargo, las otras dos fibras consiguen a ese tiempo un factor de enriquecimiento aproximadamente de 50 y un porcentaje de extracción que no supera el 10%.

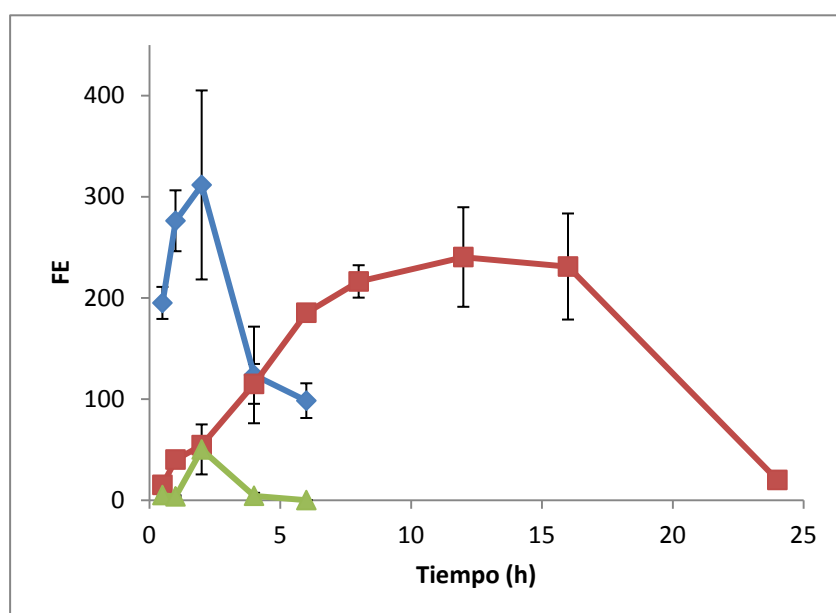


Figura 15: Variación del Factor de enriquecimiento con el tiempo de extracción para las fibras Accurel PP Q3/2 (rojo), Accurel PP 50/280 (azul) y Accurel PP S6/2 (verde).

En general, podemos decir que para el sistema Ni-DEHPA, la fibra que mejor comportamiento presenta es la Accurel PP Q3/2, ya que consigue alcanzar altos factores de enriquecimiento y porcentajes de extracción en tiempos cortos. Esto no resulta extraño teniendo en cuenta que el sistema fue optimizado para esta fibra. Sin embargo, el uso de una fibra de mayor diámetro interno permite aumentar la estabilidad en el tiempo del sistema, aunque ralentiza el transporte y tarda más en alcanzar los mismos factores de enriquecimiento. Del mismo modo, usando una fibra de menor diámetro

interno y menor tamaño de poro también se observa una disminución en la velocidad de transporte, además de una disminución de la estabilidad en el tiempo.

EFFECTO DEL TIPO DE FIBRA PARA EL SISTEMA Ni-1,2-CHBBH

Como se comentó en la introducción, el níquel es un metal que puede causar daños en los organismos por ello existen numerosos estudios para ver la biodisponibilidad de éste tanto en las aguas naturales, como en el sedimento [8, 44, 45]. Como la biodisponibilidad de un metal se relaciona con la forma en la que aparece en el medio, resulta útil desarrollar métodos que permitan diferenciar entre la fracción lábil, generalmente más biodisponible, y la no lábil. Por este motivo, se repitió el estudio anterior para un sistema que permite determinar ambas fracciones.

Para estudiar el efecto de las tres fibras para este sistema y que fuera comparable con el sistema Ni-DEHPA se tomó de nuevo como referencia la fibra Accurel PP Q3/2. El comportamiento de ésta cuando se usa 1,2-CHBBH como extractante se puede apreciar en la figura 16.

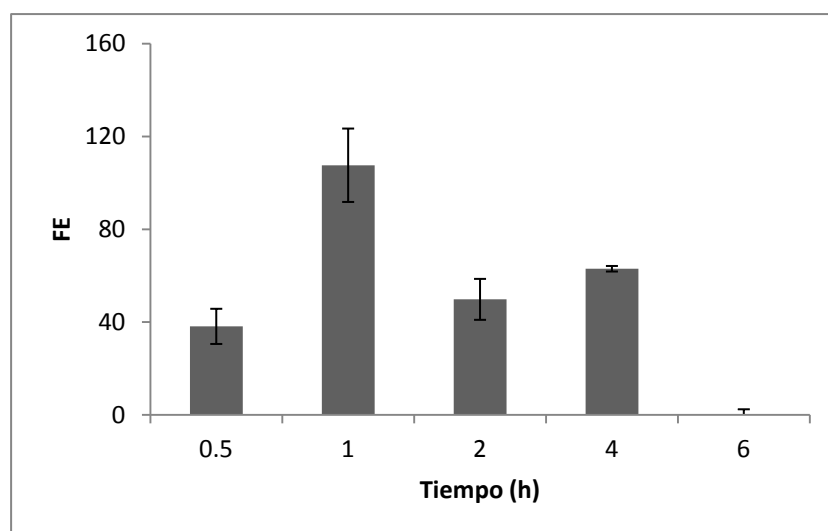


Figura 16: Factor de enriquecimiento para la fibra Accurel PP Q3/2 con respecto al tiempo.

Para este sistema los factores de enriquecimiento con respecto al sistema Ni-DEHPA son más bajos aunque el comportamiento temporal es similar, alcanzando el máximo para una hora y disminuyendo drásticamente a partir de seis horas de extracción, por la pérdida de fase orgánica comentada anteriormente. La disminución en los factores de enriquecimiento puede relacionarse con la concentración de extractante, que en este caso es mucho menor (como se recoge en el desarrollo experimental).

A continuación se presentan los resultados obtenidos con este sistema para las fibras Accurel PP 50/280 y Accurel PP S6/2 manteniendo el volumen de fase receptora constante y el área efectiva constante.

Volumen de fase receptora constante:

Al igual que antes, el estudio se empezó a realizar con la fibra pequeña, Accurel PP50/280, cuyo comportamiento puede verse en la figura 17.

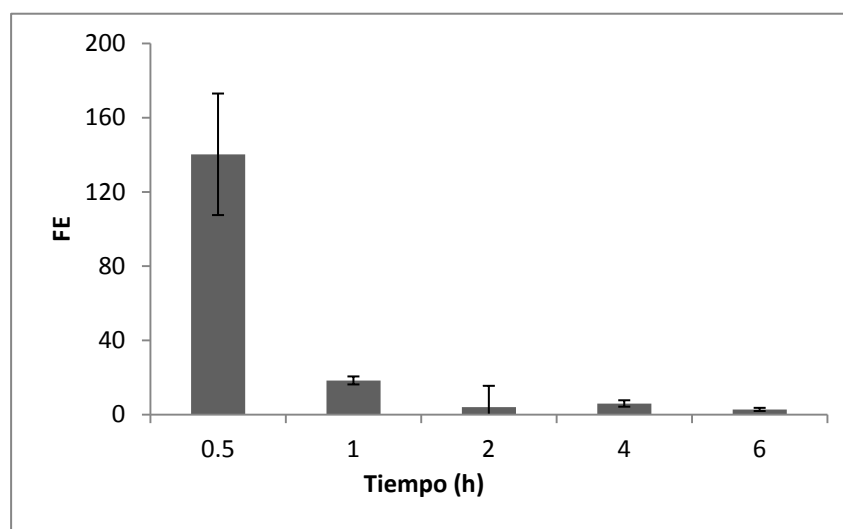


Figura 17: Variación del factor de enriquecimiento con respecto al tiempo para la fibra Accurel PP 50/280.

Como se puede ver, el máximo factor de enriquecimiento se produce en los primeros treinta minutos de extracción, produciéndose ya para una hora una brusca

caída. Como ya se ha comentado en el sistema para contenidos totales la longitud necesaria cuando se usa esta fibra hace que ésta se vea sometida a las condiciones hidrodinámicas del sistema, por lo que, cuando se incrementa los tiempo de extracción se produce la inestabilidad de la fase orgánica en los poros pudiendo salir de los mismos debido a los choques del agitador con la fibra. La mayor rapidez en el transporte en comparación con la de referencia puede relacionarse con el grosor de la pared, que en esta fibra es mucho menor, por lo que los complejos de Ni-1,2-CHBBH, pasan rápidamente hacia la fase receptora, ya que es menor la trayectoria que tiene que realizar a través de la fase orgánica. Además, al tener una gran longitud de fibra (45,5 cm) tenemos más superficie de contacto entra la fase orgánica y las fases acuosas, que en el caso de la fibra Accurel PP Q3/2 (Tabla 2), favoreciéndose en este caso el transporte a través de ella.

Para el caso de la fibra Accurel PP S6/2, se muestra su comportamiento en la figura 18.

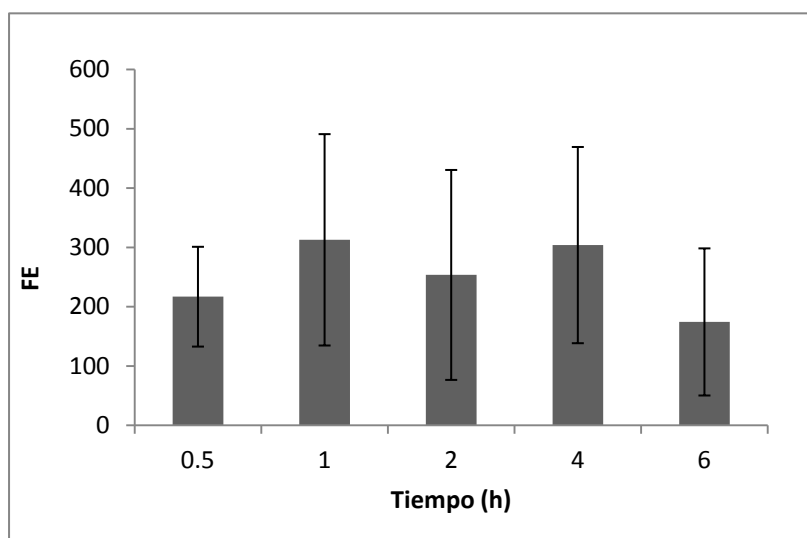


Figura 18: Resultados del factor de enriquecimiento con respecto al tiempo para la fibra Accurel PP S6/2.

En ésta se aprecia la gran irreproducibilidad del sistema, probablemente debido a la longitud de fibra con la que se trabaja. La longitud de ésta es tan pequeña, de 1,1 cm, que implica que una vez es introducida en la fase cargada ésta flota, pudiendo entrar en contacto con el aire y favoreciendo la pérdida de fase orgánica de los poros. Además se

reduce la superficie de contacto de la muestra impidiendo que el transporte pueda darse de manera homogénea. Sin embargo, este problema no se observa para el DEHPA, ya que al tener keroseno como fase orgánica la estabilidad de la disolución en los poros era mejor que la del octanol. Como se ve en las figuras 16 y 17 la disminución del factor de enriquecimiento en este caso se produce antes que para el sistema Ni-1,2-CHBBH.

Por estos motivos, que para el sistema Ni-1,2-CHBBH no es adecuado trabajar con longitudes tan pequeñas para este tipo de fibra.

En la figura 19, se compara el comportamiento de las dos fibras más finas cuando se mantiene el volumen de fase receptora constante para el sistema Ni-1,2-CHBBH. Como se comentó anteriormente, la fibra más grande (Accurel PP S6/2) no es adecuada para este sistema, por lo que no se incluye en el gráfico general.

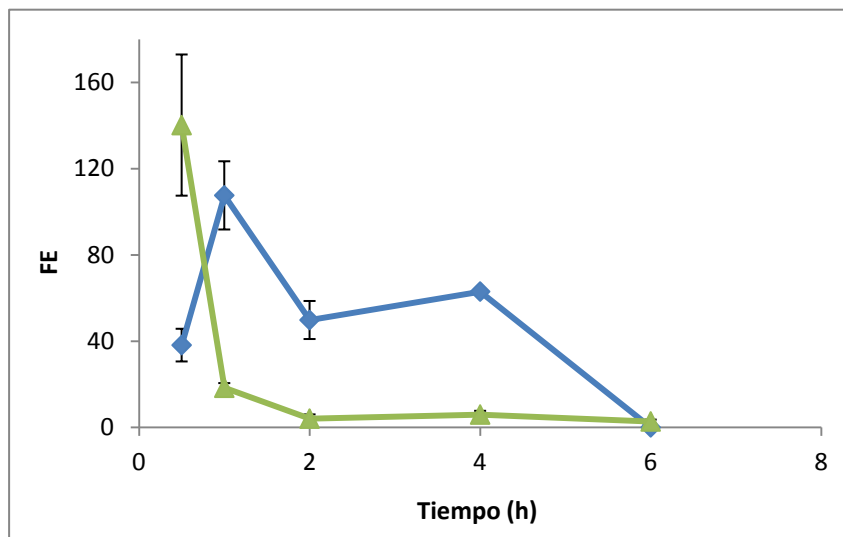


Figura 19: Factor de enriquecimiento con el tiempo de extracción para las fibras Accurel PP 50/280 (azul) y Accurel PP S6/2 (verde).

Como se puede observar, ambas fibras permiten obtener factores de enriquecimiento máximos y porcentajes de extracción similares (7%), aunque se alcanzan más rápidamente en el caso de la fibra más fina por los motivos comentados anteriormente.

En este caso parece que el tamaño de poro no afecta al transporte del metal, sin embargo, vemos que el área efectiva sí es la característica dominante, ya que la fibra

más pequeña tiene un área efectiva mayor (casi el doble) que la fibra de referencia (Tabla 2), por lo que tiene más superficie de contacto entre la fase orgánica y las fases acuosas para que se produzca el transporte. En este caso sería posible aplicar el sistema optimizado para la separación de las nanofracciones de níquel en aguas naturales, ya que no sería necesario optimizar el sistema para la fibra Accurel PP 50/280 al conseguir un alto factor de enriquecimiento en un tiempo de operación muy corto.

Al igual que para el sistema Ni-DEHPA se repitió el estudio manteniendo el área efectiva constante para eliminar el efecto de este parámetro sobre el sistema.

Área efectiva constante:

De nuevo se procedió del mismo modo que para el sistema Ni-DEHPA, tomando como referencia la fibra Accurel PP Q3/2 y calculando las longitudes necesarias de las otras dos fibras para que todas presentasen la misma área efectiva. El comportamiento de la fibra de referencia ya fue explicado anteriormente (figura 16).

En la figura 20 se ve el comportamiento de la fibra pequeña, la cual tiene el mejor factor de enriquecimiento a una hora, produciéndose después una disminución en el transporte a partir de dos horas de exposición, por problemas de estabilidad ya comentados.

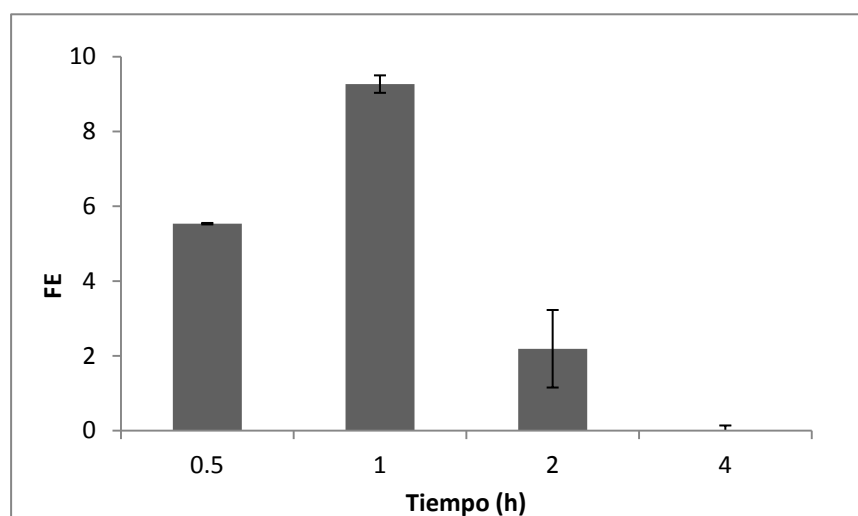


Figura 20: Factor de enriquecimiento a distintos tiempos de extracción para la fibra Accurel PP 50/280.

En comparación con el sistema anterior, lo primero que se puede apreciar es la diferencia en el factor de enriquecimiento, que es mucho menor probablemente debido a que el área efectiva en este caso también es menor, por lo que el transporte se ve ralentizado. Además, la inestabilidad de la fibra no permite evaluar el comportamiento a tiempos mayores, pero cabría esperar que pudiera seguir preconcentrando al aumentar los tiempos si el sistema fuera estable.

En el caso de la fibra grande (Accurel PP S6/2), se aprecia en la figura 21, como va aumentando progresivamente, alcanzándose el mayor factor de enriquecimiento a cuatro horas y después de este se produce la caída. Este aumento progresivo puede deberse al espesor de la fibra, ya que el analito necesita más tiempo para atravesar la fase orgánica hasta la fase receptora, como ya hemos visto anteriormente.

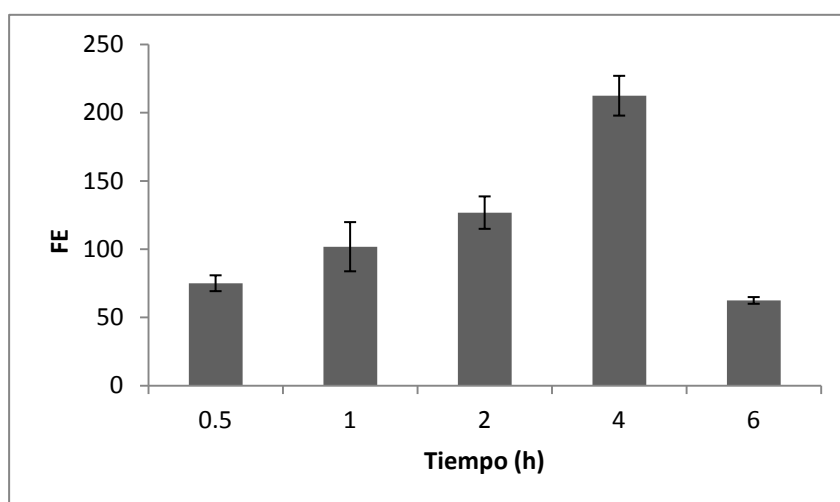


Figura 21. Factor de enriquecimiento a distintos tiempos para la fibra Accurel PP S6/2.

En comparación con el estudio anterior se puede decir que en este caso si se obtuvieron resultados reproducibles gracias a la mayor longitud de la fibra que permite una mejor estabilidad de sistema.

Para finalizar, en la figura 22, se muestra el comportamiento de las tres fibras de estudio. En esta figura se puede ver como a una hora de extracción, las fibras Accurel PP Q3/2 y Accurel PP S6/2 alcanzan el mismo factor de enriquecimiento, pero sus porcentajes de extracción son distintos, alrededor del 20% para la Accurel PP S6/2 y un 7% para la Accurel PP Q3/2.

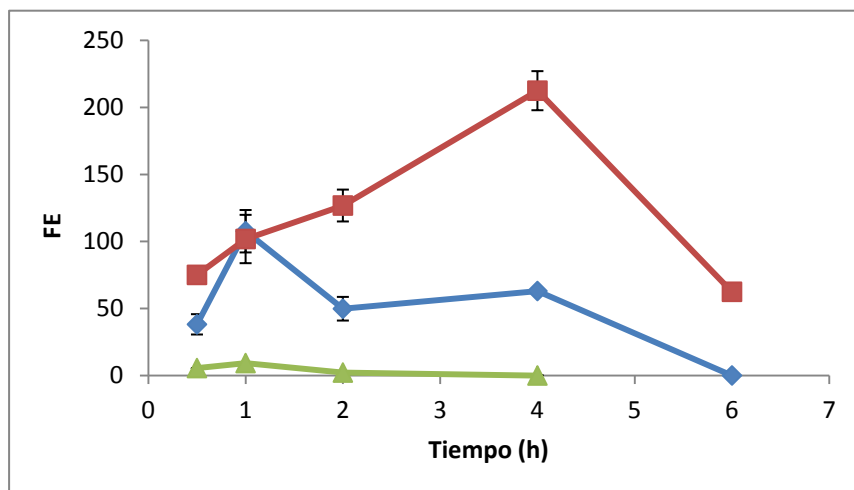


Figura 22: Factor de enriquecimiento para las fibras Accurel PP Q3/2 (rojo), Accurel PP 50/280 (azul) y Accurel PP S6/2 (verde), con respecto al tiempo de extracción.

Para concluir podemos decir que la fibra que da mejores resultados para el sistema Ni-1,2-CHBBH, es la Accurel PP S6/2, si se trabaja con longitudes mayores a 3cm para que el sistema sea estable.

CONCLUSIONES

1. En general, se ha observado que el tamaño de poro influye en el transporte del analito, ya que a menor tamaño de poro menor es el transporte que se produce.
2. Para conseguir separar las nanofracciones mediante el sistema Ni-DEHPA sería necesario realizar una optimización química e hidrodinámica del sistema utilizando la fibra Accurel PP50/280.
3. El sistema Ni-CHBBH puede ser aplicado para la separación de las nanofracciones con la fibra Accurel PP50/280 teniendo en cuenta que la longitud de la fibra debe ser de 45,5 cm. Para longitudes menores los factores de enriquecimiento son demasiado bajos.
4. Se ha observado que cuanto mayor es el espesor de la pared de la fibra, y por tanto de la fase orgánica, más tarda el sistema en llegar a los factores de preconcentración máximos, ya que como es lógico, más camino debe recorrer el analito para pasar de la fase cargada a la fase receptora.
5. A lo largo de todo este estudio se ha podido comprobar los problemas en la estabilidad de la fase orgánica, pudiendo concluir que la fibra más estable es la Accurel PP S6/2.
6. En el sistema Ni-DEHPA, que nos permite determinar los contenidos totales del metal, parece más adecuada la fibra intermedia ya que consigue una situación de compromiso entre alto factor de enriquecimiento y tiempos de preconcentración cortos.
7. En el sistema Ni-1,2-CHBBH, que nos permite cuantificar la fracción lábil, podemos concluir diciendo que la fibra Accurel PP S6/2, es la que da mejores resultados si se trabaja con longitudes mayores a tres centímetros.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] IPCS (International Programme on Chemical Safety), Environmental Health Criteria 61, World Health Organization, Geneva, 1988.
- [2] Rauch J.N., Pacyna J.M. *Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles*. Global Biogeochemical Cycles, 23, 1-16, 2009.
- [3] Stumm W., Morgan J.J. *Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. 3a Edición, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996.
- [4] Andrade Lima L.R.P., Bernardez L.A. *Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil*. Journal of Hazardous Materials. 189, 692–699, 2011.
- [5] Sivry Y., Munoz M., Sappin-Didier V., Riotte J., Denaix L., Parseval P., Destigneville C., Dupre B. *Multimetallic contamination from Zn-ore smelter: solid speciation and potential mobility in riverine floodbank soils of the upper Lot River (SW France)*. European Journal of Mineralogy, 22, 679–691, 2010.
- [6] Hudson-Edwar K.A., Jamieson H.E., Lottermoser B.G. *Mine Wastes: Past, Present, Future*. Elements, 375, 2011.
- [7] DIRECTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- [8] Zelano I., Sivry Y., Quantin C., Gelabert A., Tharaud M., Jouvin D., Montarges-Pelletier E., Garnier J., Pichon R., Nowak S., Miska S., Abollino O., Benedetti M.F. *Colloids and suspended particulate matters influence on Ni availability in surface waters of impacted ultramafic systems in Brazil*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 435, 36– 47, 2013.
- [9] Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. *Metal ions in life science, Nickel and its impact in nature*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 2007.
- [10] Roberto L. Rodríguez-Pacheco. Tesis Doctoral: *Estudio experimental de flujo y transporte de cromo, níquel y manganeso en residuos de la zona minera de Moa*

(Cuba): *Influencia del comportamiento hidromecánico*. Universidad Politécnica de Cataluña, 2002.

[11] Basso M.C., Cerrella E.G., Cukierman A.L. *Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas*. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente 6 (1), ISSN 0329-5184.

[12] Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento. Boletín oficial de la Comunidad de Madrid (BOCM n°269).

[13] DeForest D.K., Schlekot C.E. *Species sensitivity distribution evaluation for chronic nickel toxicity to marine organisms*. Integrated Environmental Assessment and Management, 9 (4), 580–589, 2013.

[14] Murai R., Kurakane K., Sekine T. *The stability constants of nickel (II) complexes with chloride, thiocyanate, sulphate, thiosulphate, and oxalate ions, as determined by a solvent extraction method*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 49, 335-336, 1976.

[15] Motekaitis R.J., Martell A.E., Speciation of metals in the oceans. I. *Inorganic complexes in seawater, and influence of added chelating agents*. Marine Chemistry, 21, 101-116, 1987.

[16] Martino M., Turner A., Nimmo M. *Distribution, speciation and particle-water interactions of nickel in the Mersey Estuary, UK*. Marine Chemistry, 88, 161-177, 2004.

[17] López-lópez J.A., García-Vargas M., Moreno C. *A new analytical method for selective pre-concentration of free silver in estuarine waters using liquid membranes*. Talanta, 108, 7-10, 2013.

[18] Anastas P.T., Warner J.C. *Green Chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press. Oxford, UK, 1998.

[19] Vergel C., Montoya R., Mendiguchia C., García-Vargas M., Moreno C. *HF-LPME as a green alternative for the preconcentration of nickel in natural waters*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 404, 665-670, 2010.

[20] Cui C., He M., Hu B. *Membrane solid phase microextraction with alumina hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese*

and nickel in environmental water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 187, 379-385, 2011.

[21] Vernekar P.V., Jagdale Y.D., Patwardhan A.W., Patwardhan A.V., Ansari S.A., Mohapatra P.K., Manchanda V.K. *Transport of cobalt(II) through a hollow fiber supported liquid membrane containing di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid (D2EHPA) as the carrier*. *Chemical Engineering Research and Design*, 91, 141-157, 2013.

[22] Lothongkum A.W., Khemglad Y., Usomboon N., Pancharoen U. *Selective recovery of nickel ions from wastewater of stainless steel industry via HFSLM*. *Journal of Alloys and Compounds*. 476, 940-949, 2009.

[23] Suren S., Pancharoen U., Thamphiphit N., Leepipatpiboon N. *A generating function applied on a reaction model for the selective separation of Pb(II) and Hg(II) via HFSLM*. *Journal of Membrane Science*. 448, 23-33, 2013.

[24] Abulhassani J., Manzoori J.L., Amjadi M. *Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry*. *Journal of Hazardous Materials*. 176, 481-486, 2010.

[25] Kislik V.S. *Liquid membranes. Principles & Applications*. Elsevier, 2010.

[26] Kokosa J.M., Przyjazny A., Jeannot M.A. *Solvent microextraction. Theory and practice*. Wiley, 2009.

[27] Moreno F., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L. *Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*. 1300, 43– 50, 2013.

[28] Li-Hua I., Xue X., Chao P., Xiao-Hong B. *Hollow fiber liposome microscreening and its application in screening and fishing membrane permeation ingredient of coumarins and lignans in traditional chinese medicine*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41 (3), 337–343, 2013.

- [29] Basheer C., Tan S.H., Lee H.K. *Extraction of lead ions by electromembrane isolation*. Journal of Chromatography A, 1213, 14-18, 2008.
- [30] Davarani S.S., Moazami H.R., Keshtkar A.R., Banitaba M.H., Nojavan S. *A selective electromembrane extraction of uranium (VI) prior to its fluorometric determination in water*. Analytica Chimica Acta, 783, 74-79, 2013.
- [31] Qdais H.A., Moussa H. *Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: a comparative study*. Desalination, 164 (2), 105–110, 2004.
- [32] Yang Z.F., Guha A.K., Sirkar K.K. *Novel membrane based synergistic metal extraction and recovery processes*. Industrial and Engineering Chemistry Research, 35 (4), 1383–1394, 1996.
- [33] Qaiser S., Saleemi A.R., Ahmad M.M. *Heavy metal uptake by agro based waste materials*. Electronic Journal of Biotechnology, 10 (3) 409–416, 2007.
- [34] Parhi P.K. *Supported liquid membrane principle and its practices: a short review*. Journal of Chemistry, Doi: 10.1155/2013/618236, 2013.
- [35] Vergel C., Mendiguchia C., García-Vargas M., Moreno C., *Quantification of free and bound fractions of nickel in natural waters by solvent extraction with 1,2-cyclohexanedione Bis-Benzoyl-Hydrazone*. Solvent Extraction and Ion Exchange, 28, 625-635, 2010.
- [36] Tao Y., Liu J.F., Wang T., Jiang G.B. *Simultaneous conduction of two- and three-phase hollow-fiber-based liquid-phase microextraction for the determination of aromatic amines in environmental water samples*. Journal of Chromatography A, 1216 (5), 756–762, 2009.
- [37] Cristina Vergel Rodríguez. Tesis Doctoral: *Desarrollo de procesos químicos de separación por membranas para la caracterización de sistemas marinos afectados por contaminación metálica*. Universidad de Cádiz, 2011.
- [38] Peretti S.W., Tompkins C.J., Goodall J.L., Michaels A.S. *Extraction of 4-nitrophenol from 1-octanol into aqueous solution in a hollow fiber liquid contactor*. Journal of Membrane Science, 195 (2), 193–202, 2002.

- [39] Sabine Müller S., Monika Möder M., Schrader S., Popp P. *Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples*. Journal of Chromatography A, 985, 99–106, 2003.
- [40] Li L., Hu B. *Hollow-fibre liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES*. Talanta, 72, 472-479, 2007.
- [41] Neplenbroek A.M., Bargeman D., Smolders C.A. *Supported liquid membranes: Instability effects*. Journal of Membrane Science. 67, 32-121.
- [42] Saleh A., Yaminia Y., Faraji M., Shariati S., Rezaee M. *Hollow fiber liquid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of ultra-trace levels of Se(IV) after derivatization in urine, plasma and natural water samples*. Journal of Chromatography B, 877, 1758–1764, 2009.
- [43] Luciano R.M., Bedendo G.C., Carletto J.S., Carasek E. *Isolation and preconcentration of Cd(II) from environmental samples using polypropylene porous membrane in a hollow fiber renewal liquid membrane extraction procedure and determination by FAAS*. Journal of Hazardous Materials, 177, 567-572, 2010.
- [44] Verschoor A.J., Vink J., Vijver M.G. *Simplification of Biotic Ligand Models of Cu, Ni, and Zn by 1-, 2-, and 3-Parameter Transfer Functions*. Integrated Environmental Assessment and Management 8 (4), 738–748, 2012.
- [45] Brumbaugh W.G., Besser JM., Ingersoll C.G., May T.W., Ivey C.D., Schlegel C.E., Rogevich E. *Preparation and characterization of nickel-spiked freshwater sediments for toxicity tests: toward more environmentally realistic nickel partitioning*. Environmental Toxicology and Chemistry 32 (11), 2482–2494, 2013.

Anexo I: Materiales, Instrumentación y Reactivos

Materiales

- Botes de polietileno de baja densidad, de 30 ml.
- Fibra hueca capilar, Accurel PP 50/280, Membrana (Alemania).
- Fibra hueca capilar, Accurel PP Q3/2, Membrana (Alemania).
- Fibra hueca capilar, Accurel PP S6/2, Membrana (Alemania).
- Jeringa farmacéutica de plástico de 1ml BD-Micro-Fine (Beckton and Dickinson, EE.UU.).
- Jeringa Hamilton de 100 µl (Hamilton, Suiza).
- Matraces aforados de vidrio de volúmenes comprendidos entre 10 y 1000 ml.
- Micro pipetas de volúmenes comprendidos entre 200 y 1000 µl.
- Pipetas de vidrio graduadas de volúmenes comprendidos entre 1 y 25 ml, de vaciado completo y doble enrase.
- Placas de Petri.
- Soldador.
- Tubos de vidrio con tapones roscados y viales para medidas por automuestreador GFAAS.
- Vasos de precipitado de volúmenes comprendidos entre 50 y 100 ml.

Instrumentación

- Agitadores magnéticos.
- Balanza electrónica AA-160 (Denver Instrument Company).
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica. CONTRAA 700 (Analytik Jena).
- pHmetro y conductímetro 4330 (Jenway).

Reactivos

- 1,2-Ciclohexanodiona suministrado por P. Síntesis, Merck.
- Ácido Acético al 100%, suministrado por Panreac.
- Ácido Clorhídrico al 30%, suministrado por Panreac.

- Ácido Nítrico al 65%, suministrado por Scharau.
- Benzoílhídrica al 98% suministrado por Ega-Chemie.
- 1,2-CHBBH, sintetizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz.
- DEHPA, suministrado por Sigma-Aldrich.
- HEPES suministrado por Biochemical (BDH).
- Hidróxido Sódico, suministrado por Panreac.
- Keroseno, suministrado por Panreac.
- Octanol al 90%, suministrado por Panreac.
- Patrón de Ni de 1000 mgL^{-1} suministrado por Fluka.
- Tolueno, suministrado por Fluka.

Anexo II: Síntesis del reactivo 1,2-CHBBH

Los pasos que se siguieron para llevar a cabo la síntesis de la 1,2-ciclohexanodiona bis benzoíl-hidrazona son los que aparecen a continuación.

1. En un vaso de precipitados se pesan 0,168 gramos de 1,2-ciclohexanodiona y en otro vaso 0,409 gramos de benzoílhídracida y se disuelven en 15 mililitros de etanol cada uno.
2. Se vierten las disoluciones anteriores en un matraz de fondo redondo y se añaden tres gotas de ácido clorhídrico concentrado.
3. La mezcla de reacción se pone a reflujo durante 30 minutos sumergida parcialmente en un baño caliente.
4. Luego se deja enfriar y se vierte el contenido del matraz en un vaso de precipitados. Se vierten 90 mililitros de agua milliQ en el matraz de fondo redondo poco a poco intentando recoger los precipitados que se han podido formar en la mezcla de reacción.
5. El vaso de precipitados se tapa con un trozo de Parafilm y se introduce en el frigorífico durante toda la noche.
6. Al día siguiente se filtra para recoger el precipitado de color amarillo formado y con un poco de agua milliQ se recogen los restos del precipitado que queden en el vaso.
7. El precipitado filtrado se introduce en la estufa a 80°C hasta que esté completamente seco.
8. Para recrystalizar el reactivo sintetizado, se disuelve de nuevo en la mínima cantidad de etanol posible calentándolo (incluso evaporando un poco de etanol).
9. Una vez disuelto se añade agua milliQ guardando la relación 1:3 etanol/agua y se introduce en el frigorífico hasta el día siguiente.
10. Al igual que antes, se realizan los pasos 6 y 7, obteniendo un precipitado mucho más limpio y de un color amarillo más claro que el anterior.